

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Martha Liliana Arcos¹
Faisury Ossa¹
Tito Efraín Díaz²

ABSTRACT

Title: Cryopreservation of native isolates of ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes*.

In this study, the technique of cryopreservation in liquid nitrogen to preserve native isolates of the fibrolytic bacteria *Fibrobacter succinogenes* was standardized. The technique efficiency was evaluated by establishing the bacterium viability during one year. The MacFarland scale, widely used to estimate aerobic bacterial populations, was validated by the roll tube technique ($R^2=0.95$). Two native *F. succinogenes* strains, C7 and C9, were used. These strains were obtained from cattle fed on *Brachiaria decumbens* in the eastern lowlands of Colombia. Fifteen days after the initiation of the cryopreservation process, a reduction in the number of viable bacteria (CFU ml⁻¹) was registered (C7 from 9.25×10^8 to 6.15×10^8 and C9 from 12.51×10^8 to 9.26×10^8). However, the bacterial populations did not present differences in subsequent samplings (C7= $6.13 - 6.16 \times 10^8$, C9= $9.26 - 9.35 \times 10^8$ CFU ml⁻¹, range over a year). Results indicated that the standardized cryopreservation technique is an effective and easy procedure to preserve ruminal bacteria, which would be a very useful tool to create a germplasm bank of Colombian ruminal anaerobic microorganisms. The cryopreservation technique, and the MacFarland scale have an advantage over other methods of preserving bacteria and methods of estimating populations of bacteria by active cultures. The procedures used in this research are reliable and economical techniques using minimal storage spaces and laboratory resources.

Key words: Cellulolytic bacteria, population, turbidimetric standard, cryopreservation, viability.

1. Microbiólogas MSc; CORPOICA, Programa de Fisiología y Nutrición Animal, CI Tibaitatá. 2. MVZ PhD, CORPOICA, Subdirección de Investigación Estratégica, CI Tibaitatá, A.A. 240142 Las Palmas, Bogotá, Colombia. Mail to: martha_ab@email.com; ediaz@corpoica.org.co

Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*

RESUMEN

En el presente trabajo se estandarizó una técnica de criopreservación en nitrógeno líquido, usando como crioprotector dimetil sulfóxido al 5%, para la preservación de aislados nativos bacterianos de *Fibrobacter succinogenes*. El respectivo protocolo de criopreservación se evaluó determinando la viabilidad bacteriana por el transcurso de un año. La escala de MacFarland, ampliamente conocida en la estimación de poblaciones bacterianas aerobias, fue validada como técnica de estimación de bacterias anaerobias, usando la técnica de conteo bacteriano por *roll-tube* ($R^2 = 0.95$). Se utilizaron dos aislados nativos, C7 y C9, de *Fibrobacter succinogenes*, obtenidos del rumen de bovinos en pastoreo de *Brachiaria decumbens*, en los Llanos Orientales de Colombia. Quince días después de la exposición de los cultivos al proceso de criopreservación, se apreció una reducción en el número de bacterias viables con relación a la población inicial de cada uno de los aislados (C7 = 9.25×10^8 UFCml⁻¹ vs. 6.15×10^8 UFCml⁻¹ y C9 = 12.51×10^8 UFCml⁻¹ vs. 9.26×10^8 UFCml⁻¹). Sin embargo, no se presentaron diferencias en la población de bacterias viables en los muestreos posteriores (C7 = $6.13 - 6.16 \times 10^8$; C9 = $9.26 - 9.35 \times 10^8$ UFCml⁻¹). Esta técnica permite mantener la viabilidad bacteriana y puede considerarse como un procedimiento eficiente y de fácil aplicación para la preservación de bacterias ruminales. Además, constituye una herramienta fundamental para el establecimiento de bancos de germoplasma de microorganismos anaerobios ruminales en Colombia. El uso conjunto de las técnicas de criopreservación y la escala de MacFarland, posee ventajas sobre los métodos de preservación y estimación de poblaciones por cultivos activos, por su confiabilidad, eficiencia y bajo costo.

Palabras clave: Bacterias celulolíticas, población, estándar de turbidez, criopreservación, viabilidad.

INTRODUCCIÓN

EL MANTENIMIENTO *in vitro* de cultivos activos requiere una cantidad considerable de trabajo, y ocasiona inestabilidad genética de los aislados microbianos (Teather, 1982; Malik, 1991; Velicier *et al.*, 1998). Por esta razón, para la preservación de microorganismos se han desarrollado nuevas metodologías como la congelación de cultivos a -20°C o -40°C , y la preservación en nitrógeno líquido a -196°C ; con la cual se han obtenido los mayores índices de supervivencia y estabilidad genética microbiana (Malik, 1988).

Por otro lado, la determinación de la viabilidad de las poblaciones bacterianas en cultivos *in vitro* es un procedimiento esencial para la adecuada utilización de estos microorganismos. En este sentido, la cuantificación de la población de bacterias celulolíticas ruminales viables se ha realizado usando la técnica de *roll tube*, mediante recuento de unidades

formadoras de colonias (UFC) en cultivo sólido (Hungate, 1966; Mojica, 1993). No obstante, este método demanda gran cantidad de tiempo, labor y recursos. En los laboratorios de microbiología clínica con énfasis en aerobios, se han superado estas dificultades, usando el estándar de MacFarland, que estima poblaciones microbianas comparando índices de turbidez del estándar con los logrados del cultivo microbiano (Carpenter, 1969; Koneman *et al.*, 1987; Gerhardt *et al.*, 1994); no obstante, en el desarrollo de estudios sobre anaerobios todavía se presentan muchas limitaciones. En este trabajo se validó el estándar de MacFarland para estimar poblaciones bacterianas de *Fibrobacter succinogenes* aisladas de bovinos en pastoreo de *Brachiaria* en los Llanos Orientales, mediante comparación con la técnica de cultivo en *roll tube*. Así mismo, y como objetivo principal de

este estudio, se estandarizó un método de criopreservación en nitrógeno líquido de estos aislados nativos y se evaluó su efectividad a través del recuento de bacterias viables durante un año.

Materiales y métodos

Cultivos bacterianos. Se utilizaron dos aislamientos, C7 y C9, de la especie *Fibrobacter succinogenes*, obtenidos del contenido ruminal de bovinos en pastoreo de *Brachiaria* (*Brachiaria decumbens*), en el Piedemonte del departamento del Meta, siguiendo el proceso descrito por Mojica (1993) y Rodríguez *et al.* (1996). Las bacterias obtenidas fueron cultivadas en completa anaerobiosis, utilizando el método de *roll tube* (Hungate, 1966; Bryan, 1972; Mojica, 1993). Los aislamientos fueron identificados a través de métodos microscópicos, macroscópicos, y técnicas moleculares mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Moore y Moore, 1977; Hobson, 1988; Ossa, 1999).

Preparación de la escala de MacFarland. Se prepararon los diez patrones de turbidez de la escala de MacFarland, con cloruro de bario y ácido sulfúrico al 1% (Tabla 1). Cada patrón de turbidez representó una concentración bacteriana, expresada en un número aproximado de bacterias viables $\times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ (Lennette *et al.*, 1980; Li *et al.*, 1993).

Validación de la escala de MacFarland para la cuantificación de bacterias celulolíticas ruminales. La densidad óptica de los diez patrones de la escala de MacFarland se determinó a diferentes longitudes de onda (540, 600 y 640 nm), usando tres replicas para cada patrón de turbidez. La longitud de onda de máxima absorción se estableció a través del coeficiente de determinación. Para validar la escala de MacFarland se correlacionaron las absorbancias del estándar con las de los cultivos de *Fibrobacter succinogenes*, realizando recuento poblacional mediante la técnica de *roll tube* (Hungate, 1966; Bryan, 1972; Mojica, 1993).

Preparación del inóculo bacteriano para la criopreservación. El medio de aislamiento y crecimiento de las bacterias ruminales celulolíticas incluyó los siguientes componentes: Solución salina I (3 g de K_2HPO_4 en 1 litro de agua) 15 ml; solución salina II (3 g de KH_2PO_4 , 6 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g de NaCl, 1.23 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y 0.79 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

15 ml en 1 litro de agua; fluido ruminal clarificado 40 ml; extracto de levadura 0.250 g; celobiosa 0.100g; NHCO_3 0.600g; resazurin 0.100 mg; HCl-cisteína 0.100g; 1% de mezcla vitamínica (20 mg de biotina, 20 mg de ácido fólico; 100 mg de piridoxina monohidrocloreada, 50 mg de rivotina, 50 mg de tiamina, 50 mg de ácido nicotínico, 50 mg de ácido pantoténico, 50 mg de 4-para-amino benzoico, en 100 ml de agua) y agua destilada hasta completar un volumen final de 100 ml.

Los aislamientos C7 y C9 se cultivaron durante 24 horas a 39°C (Hungate, 1972; Hennig y Vander, 1978). A partir de estos cultivos se inocularon medios de crecimiento a una concentración de 9% (v/v) (Arcos, 1998), realizando 12 réplicas para cada aislado microbioal. Los cultivos se incubaron a 39°C , hasta alcanzar la etapa final de la fase logarítmica y comienzo de la fase estacionaria de crecimiento. Esta fase se determinó por lectura de las absorbancias en espectrofotómetro a 640 nm (Arcos, 1998) y la población bacteriana se cuantificó mediante el método de *roll tube* (Hungate, 1966; Mojica, 1993). La población bacteriana se estimó comparando el grado de turbidez de los cultivos de *F. succinogenes*, con los patrones de turbidez de la escala de MacFarland. Los cultivos de los aislamientos se incubaron hasta alcanzar concentraciones de 12×10^8 células ml^{-1} , población correspondiente al patrón número 4 de la escala de MacFarland (Tabla 1).

Criopreservación de las bacterias en nitrógeno líquido. Los cultivos de los aislamientos C7 y C9, con poblaciones de 12×10^8 células ml^{-1} , se centrifugaron a $4000 \times g$ durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó y al precipitado se le adicionaron 3 volúmenes de agente crioprotector (dimetil sulfoxido estéril al 5 % [p/v en agua destilada]),

esta suspensión se mezcló para permitir un congelamiento gradual del preparado microbioal, y se refrigeró a 4°C por 15 minutos, para lograr estabilidad de las células. Se tomaron alícuotas de 1.0-1.5 ml, se dispensaron en crioviales, y se ubicaron en criocañes de aluminio, para pasar a la fase de nitrógeno líquido por tres minutos. Finalmente, se almacenaron en el tanque de nitrógeno. Todos los procedimientos descritos anteriormente se realizaron bajo condiciones de anaerobiosis (Malik, 1991).

Viabilidad bacteriana después del proceso de criopreservación. Dos crioviales correspondientes a cada una de los aislamientos C7 y C9, se extrajeron del tanque de nitrógeno, a los 15, 30, 60, 180, y 365 días posteriores al proceso de criopreservación. Los crioviales se sometieron a una temperatura de 37°C , hasta su licuefacción. Cincuenta micro-litros de material criopreservado se inocularon en 10 ml de medio de crecimiento (Malik, 1991/1992). Los aislamientos se sembraron en las diluciones 1×10^{-6} y 1×10^{-7} , siguiendo la técnica de *roll tube* (Mojica, 1993; Bryant, 1972; Hungate, 1966). Los cultivos fueron cuantificados en UFC ml^{-1} , mediante el método de *roll tube* y por turbidez usando el estándar de MacFarland, para determinar la viabilidad bacteriana después del proceso de criopreservación.

Análisis estadístico. Los valores de las absorbancias obtenidos de la lectura de la densidad óptica a 640 nm sobre los patrones de turbidez de la escala de MacFarland, se correlacionaron con los datos de las poblaciones microbianas obtenidas a partir del recuento bacteriano en UFC ml^{-1} , mediante la técnica de *roll tube*. Con base en esta información se generó la ecuación para la estimación de poblaciones microbiales:

Tabla 1. Preparación de la escala de MacFarland.

Patrón N°	Cloruro de bario 1% (ml)	Ácido sulfúrico 1% (ml)	Concentración bacteriana (células $\times 10^8 \text{ ml}^{-1}$)
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

$$Y = -0.173 + 21.186X$$

Donde, Y: concentración de células en UFC ml⁻¹ y X: absorbancias de los cultivos bacterianos.

Los datos del recuento poblacional obtenidos de la técnica de *roll tube* se analizaron mediante el diagnóstico de influencias (*out-layer*), para evitar los errores sistemáticos, y con base en estos valores se validó la escala de MacFarland para la estimación de las poblaciones de *F. succinogenes*. La correlación de estos dos métodos generó la regresión:

$$Y = 1.44 + 0.76X$$

Donde, Y: concentración de células en UFC ml⁻¹ por *roll tube*; y X: población estimada por la escala de MacFarland en UFC ml⁻¹.

Resultados y discusión

Validación de la escala de MacFarland para la cuantificación de bacterias celulolíticas ruminales

La máxima absorbancia de los patrones de turbidez de la escala de MacFarland, se registró a una longitud de onda de 640 nm, con la cual se realizó la lectura de las absorbancias de los aislamientos bacterianos C7 y C9.

Con el método de *roll tube* se determinó la población bacteriana en UFC x 10⁸ ml⁻¹ en cada lectura de absorbancia; mediante la correlación de las absorbancias y los recuentos poblacionales se obtuvo la ecuación para estimar poblaciones de bacterias:

$$Y = -0.173 + 21.186 X$$

con valores de R² = 0.98; S_{xy} = 1.06; y donde Y: concentración de células en UFC ml⁻¹ y X: absorbancias de los cultivos bacterianos.

Los valores de las poblaciones estimadas y de las poblaciones obtenidas usando *roll tube*, presentaron una correlación del 97% (Tabla 2). La regresión siguiente:

$$Y = 1.44 + 0.76X$$

Donde, Y: concentración de células en UFC ml⁻¹ por *roll tube*, y X: población estimada por la escala de MacFarland en UFC ml⁻¹, muestra la validez de la escala de MacFarland para estimar población de bacterias anaerobias ruminales (R² = 0.95; S_{xy} = 0.41).

Los resultados de este estudio muestran que el estándar de MacFarland es una herramienta validada para la estimación de poblaciones de bacterias celulolíticas del rumen, y coinciden con los reportes realizados por Carpenter, (1969) y Gerhardt *et al.*, (1994), dirigidos al estudio de cultivos aerobios, donde el estándar de MacFarland representa un procedimiento práctico, rápido, simple, confiable y económico.

Criopreservación en nitrógeno líquido y viabilidad de las poblaciones bacterianas. Quince días después del proceso de criopreservación, se presentó una reducción en las poblaciones de 34% y 26% en los aislamientos C7 y C9, respectivamente; sin embargo, el número de bacterias viables permaneció constante en los recuentos posteriores (C7 = 6.13 a 6.16 x 10⁸ UFC ml⁻¹; C9 = 9.26 a 9.35 x 10⁸ UFC ml⁻¹, rango de un año) (Tabla 3). Las tasas de

supervivencia de los aislamientos C7 y C9, obtenidos en el presente trabajo (66 y 74%, respectivamente) superan ampliamente a las reportadas por Wolff *et al.* (1990), con la técnica de preservación por congelamiento a -15° C (31 - 35%).

Tabla 3. Efecto del proceso de criopreservación sobre la viabilidad de las bacterias celulolíticas durante un año

Tiempo días	Población de la especie en UFC ml ⁻¹ X 10 ⁸	
	Fibrobacter succinogenes (C9)	Fibrobacter succinogenes (C7)
0	12.51 ^a	9.25 ^a
15	9.26 ^{a,b}	6.16 ^b
30	9.30 ^b	6.13 ^b
60	9.34 ^b	6.15 ^b
180	9.35 ^b	6.13 ^b
365	9.31 ^b	6.15 ^b
EE	0.099	0.032

Valores promedios en cada columna con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas (P < 0.001). EE = Error Estándar de la Media. (n = 18; n = 12)

La reducción de las poblaciones bacterianas durante el proceso de criopreservación, está asociada con los cambios en la concentración de sales y otros metabolitos que producen deshidratación de las células e imbalance osmótico (Malik, 1991). Por otra parte, Mackie y Therion (1984) indican que las bacterias Gram negativas son más sensibles a los cambios osmolares que las Gram positivas, diferencia relacionada con las características de la pared bacteriana; aspecto de gran importancia en el presente estudio, dado que *Fibrobacter succinogenes* es una bacteria Gram negativa. En el proceso de criopreservación, las bacterias Gram negativas sufren cambios en la estructura física de su pared celular por la gran cantidad de lípidos que la componen, lo que ocasiona dilatación de los poros de la membrana y facilita la lisis celular. Además, en la fase de enfriamiento, la ruptura celular ocurre debido a la formación de grandes cristales de hielo, generados por el agua intracelular presente (Malik, 1991). Teniendo en cuenta los factores físicos bacterianos asociados al proceso, durante el desarrollo de este trabajo, se controlaron los cambios bruscos de temperatura, utilizando como crioprotector dimetil-sulfóxido al 5% (v/v en agua destilada); al mismo tiempo, con el dimetil-sulfóxido,

Tabla 2. Estimación de la población bacteriana en UFC ml⁻¹ a partir de las absorbancias obtenidas

Tiempo (días)	Población bacteriana en UFC ml ⁻¹ X 10 ⁸					
	Cepa 9			Cepa 7		
	Roll tube	Turbidometría		Roll tube	Turbidometría	
	Población	Absorbancia (nm)	Población estimada Y = -0.173 + 21.186 X	Población	Absorbancia (nm)	Población estimada Y = -0.173 + 21.186 X
0	12,51	0,621	13,34	12,5	0,509	10,6
15	9,26*	0,508	10,59*	6,16	0,291	5,99
30	9,30	0,511	10,65	6,13	0,289	5,95
60	9,34	0,512	10,67	6,15	0,291	5,99
180	9,35	0,511	10,65	6,13	0,290	5,97
360	9,31	0,510	10,63	6,15	0,289	5,95

(n = 18, *n=12)

se minimizaron los efectos sobre el crecimiento celular, la capacidad de adhesión y actividad enzimática de bacterias celulolíticas del rumen reportados por Roger *et al.* (1992); cuando emplearon en sus estudios glicerol como criopreservante. Adicionalmente, para mantener la viabilidad de las bacterias, se manejaron cultivos microbianos al final de la fase logarítmica e inicio de la fase estacionaria, con el propósito de controlar variables como condiciones óptimas de crecimiento, estado fisiológico de las células y densidad celular. Así mismo, la alta densidad bacteriana (12×10^8 UFC ml⁻¹) utilizada en este trabajo, compensa la susceptibilidad al choque por enfriamiento que presentan las bacterias en la fase exponencial de crecimiento, debido a su baja concentración de pared celular (Hsu y Fahey, 1990); para evitar la lisis celular los cultivos se centrifugaron a 4000 x g, teniendo en cuenta los resultados reportados por Hsu y Fahey, (1990) y Malik, (1990).

La técnica de criopreservación estandarizada en este trabajo permite mantener alta viabilidad microbiana; también es de fácil adaptación para la preservación de otras especies microbianas de origen ruminal y de microorganismos provenientes de otros ecosistemas naturales. La implementación de la técnica estandarizada proporciona la base para establecer un banco de referencia de microorganismos ruminales provenientes del trópico colombiano.

Conclusiones

Los resultados de viabilidad bacteriana muestran que el proceso de criopreservación estandarizado en este trabajo es un método confiable en la preservación de bacterias de la especie *Fibrobacter succinogenes*. Este método de criopreservación soluciona la necesidad de preservar y mantener aislamientos bacterianos por largos periodos de tiempo, sustituyendo el uso de cultivos activos, que exigen pases continuos y ocasionan inestabilidad genética en los microorganismos. La técnica de criopreservación implementada en este estudio podría constituirse en una herramienta fundamental para la preservación de otras especies de origen ruminal obtenidas de importantes sistemas ganaderos del trópico Colombiano. Además, el método de criopreservación estandarizado constituye un procedimiento de gran aplicación en los bancos de germoplasma, para la preservación de microorganismos procedentes de otros ecosistemas.

De otra parte, los resultados obtenidos mostraron la validez del estándar de MacFarland para estimar el número de bacterias ruminales viables en cultivos de crecimiento. Los resultados indican que este método puede sustituir la técnica de conteo de colonias en *roll tube*, cuando se requiere estimar poblaciones bacterianas con la técnica de criopreservación. Con el estándar de MacFarland es posible determinar la concentración bacteriana óptima para el proceso de criopreservación, cuando se lleva a cabo al final de crecimiento exponencial y principio de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. Además, la escala de MacFarland es una herramienta útil para evaluar la viabilidad bacteriana después del proceso de criopreservación. El método validado es efectivo para ser usado en otros procedimientos que requieran la estimación de concentraciones bacterianas del rumen, facilita la preparación de inóculos con poblaciones estimadas y demostró ser un método rápido, confiable y económico.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros sinceros agradecimientos al Dr. Germán Afanador Téllez, por su contribución en el desarrollo de este estudio, especialmente por su orientación en la evaluación de los resultados. Agradecemos también a la Dra. Claudia Ariza Nieto por su orientación en los análisis estadísticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Arcos, M.L. 1998. Aislamiento, conservación y evaluación de la cinética de crecimiento y actividad celulolítica de cepas de *Fibrobacter succinogenes* de bovinos en pastoreo de gramíneas tropicales. Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Bryant, M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 1324-1328.
- Carpenter, L. 1969. Microbiología. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana S.A. México DF. p. 205-215.
- Gerhardt, R.G.; Murray, E.; Wood, W.; Krieg, L.R. 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington. 50 p.
- Hobson P. N., 1988. The rumen microbial ecosystem. Elsevier. London and New York, pp. 527.
- Hsu, J.T.; G. C. Fahey. 1990. Effects of Centrifugation Speed and Freezing on Composition of Ruminant Bacterial Samples Collected from Defaunated Sheep. *J. Dairy Sci.* 73: 149 -152.
- Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press. New York and London. 533.
- Hungate R. E. 1972. In Challenging biological problems directions toward their solution. J.A. Behnke, pp 343-56. New York: Oxford Univ. Press.
- Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Dowell V. R.; Sommers, H. M. 1987. Diagnóstico microbiológico. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. p. 386.
- Lenette, E. H.; A. Balows; W. J. Jr. Hausley; J. R. Truant. 1980. Manual of Clinical Microbiology. Third edition. American Society for Microbiology. Washington, U.S.
- Li, R. C.; D. E. Nix; J. J. Schentag. 1993. New turbidimetric assay for quantification of viable bacteria densities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2: 371-374.
- Mackie, R. I.; J.J. Therion. 1984. Influence of mineral interactions on growth efficiency of rumen bacteria. Herbivore nutrition in the subtropics and tropics. The Sci. Press. Craighall, So Afr. 45.
- Malik, K. A. 1988. A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria. *J. Microbiol. Methods* 8:259-271.
- Malik, K. A. 1990. Use of activated charcoal for the preservation of anaerobic phototrophic and other sensitive bacteria by freeze-drying. *J. Microbiol. Methods*. 12: 117-124.
- Malik, K. A. 1991. Cryopreservation of bacteria with special reference to anaerobes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 7:629-632
- Malik, K. A. 1992. A new method for preservation of microorganisms by liquid-drying under anaerobic conditions. *J. Microbiol. Methods*. 14:239-245.
- Mojica, J.R. 1993. Estandarización del método *Roll Tube* para el conteo y aislamiento de bacterias anaerobias ruminales. Tesis; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. 1-138 pp.
- Moore L. V. H., Moore W. E.C. 1977. The Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe. Laboratory Blacksburg, Virginia.
- Ossa, F. 1999. Identificación molecular de bacterias celulolíticas ruminales y degradación de la pared celular de *Bouteloua repens* por cepas nativas de *Ruminococcus flavefaciens*. Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Rodríguez, F.; Díaz, T.; Mackenzie, G.; Guatita, L.; Afanador, G. 1996. Aislamiento, patrón de fermentación de carbohidratos y caracterización morfológica de bacterias celulolíticas del rumen de bovinos alimentados con heno de raigrás en Colombia. *Rev. Corpoica* 1(1):23-28.
- Roger V.; Fonty, G.; Andre, C.; Gouet, P. 1992. Effects of Glycerol on the growth, Adhesion, and Cellulolytic Activity of Rumen Cellulolytic Bacteria and Anaerobic Fungi. *Current Microbiology* 25: 197-201
- Teather R. 1982. Maintenance of Laboratory Strains of Obligately Anaerobic Rumen Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2: 499- 501.
- Velicier, G. J.; Kross, L.; Lenski, R. E. 1998. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 95: 12376-12380.